

## Fungos de armazenagem e micotoxinas em dieta para ovinos (*Ovis aries* L.): estudo de caso

Carlos Eduardo da Silva Soares<sup>1\*</sup>, Camila Siedlarczyk Martins<sup>2</sup>, Giovana Sousa Maria<sup>3</sup>, Vildes Maria Scussel<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Mestrando em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis, SC, Brasil [c.ess@posgrad.ufsc.br](mailto:c.ess@posgrad.ufsc.br)

<sup>2</sup>Graduanda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis, SC, Brasil [camila.sied@gmail.com](mailto:camila.sied@gmail.com)

<sup>3</sup>Graduanda em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Federal de Santa Catarina – UFSC – Florianópolis, SC, Brasil [giovana.maria.gsm@gmail.com](mailto:giovana.maria.gsm@gmail.com)

<sup>4</sup>Professora Dra. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos – UFSC – Florianópolis, SC, Brasil [vildescussel\\_2000@yahoo.co.uk](mailto:vildescussel_2000@yahoo.co.uk)

\*Autor para correspondência: Laboratório de Micotoxicologia e Contaminantes de Alimentos – LABMICO. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de ciências agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod Admar Gonzaga 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC, Brasil.

**RESUMO.** Fungos e suas condições de armazenagem (umidade) e a contaminação por micotoxinas em alimentos oferecidos para ovinos foram avaliados. Animais da raça crioula criados na Fazenda Ressacada-UFSC e com saúde debilitada. Com as amostras de (a) feno de alfafa (*Medicago sativa* L.) estavam armazenadas em 3 pontos (entrada do galpão, aprisco e sala), além de (b) pastagem (*B. decumbens*) obtida no campo e (c) ração (milho e soja) armazenada no aprisco. O gênero fúngico mais detectado foi o *Aspergillus*, seguido do *Penicillium* em 75 e 40% das amostras, respectivamente. Cepas toxigênicas (produtoras de AFLs) foram identificadas. Quanto a umidade (mc e aw) os teores variaram entre 12-40% (média:12%) e  $a_w$ : 0,5029-0,9888 (média: 0,5783), considerado adequado para proliferação de fungos. Das micotoxinas avaliadas (aflatoxinas - AFL<sub>s</sub>, ocratoxina A - OTA, zearalenona - ZON e esterigmatoscistina - EST), as de armazenagem (AFL<sub>s</sub>: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) foram detectadas com teores de 128 µg/kg nas amostras de feno. As condições de limpeza (armazém e maquinários) são de extrema importância, uma vez que as amostras recém-chegadas ao local de abrigo das ovelhas se encontram contaminadas.

**Palavras chave:** Alfafa, feno, micotoxinas, multitoxinas, pasto, ração

## *Storage fungi and mycotoxins in sheep diet (Ovis aries L.): a case study*

**ABSTRACT.** Fungi and their storage conditions (moisture) and contamination by mycotoxins in foods offered to sheep were evaluated. Crioula animals created at Farm Ressacada – UFSC and with weakened health. The samples of alfalfa hay (*Medicago sativa* L.) were stored at 3 points (entrance of the shed, sheepfold and room), besides (b) pasture (*B. decumbens*) obtained in the field and (c) ration (Corn and soybean) stored in the sheepfold. The most detected fungal genus was *Aspergillus*, followed by *Penicillium* in 75 and 40% of the samples, respectively. Toxigenic strains (AFLs producers) were identified. As regards moisture (mc and aw) the contents ranged from 12-40% (mean: 12%) and  $a_w$ : 0.5029-0.9888 (mean: 0.5783), considered adequate for fungal growth. Mycotoxins (AFLs: AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>) were detected at levels of 128 µg/kg in the hay samples. Cleaning conditions (warehouse and machinery) are of the utmost importance, since samples newly arrived at the shelter of the sheep are contaminated.

**Keywords:** alfalfa, feed, hay, multitoxins, mycotoxins, pasture

## ***Hongos de almacenamiento y micotoxinas en la dieta para ovinos (Ovis aries L.): estudio de caso***

**RESUMEN.** Se evaluaron los hongos, las condiciones de almacenamiento (humedad) y la contaminación por micotoxinas en alimentos ofrecidos para ovinos. Animales de raza criolla criados en la Hacienda Resaca-UFSC y con salud debilitada. Con muestras de heno de alfalfa (*Medicago sativa* L.) que estaban almacenadas en 3 puntos (entrada del galpón, aprisco y sala), además de (b) forraje (*B. decumbens*) obtenida en el campo y (c) ración (Maíz y soja) almacenada en el aprisco. El género fúngico más detectado fue el *Aspergillus*, seguido del *Penicillium* en el 75 y el 40% de las muestras, respectivamente. Se identificaron cepas toxigénicas (productoras de aflatoxinas). En cuanto a la humedad (mc y aw) los niveles variaron entre el 12-40% (promedio: 12%) y aw: 0,5029-0,9888 (promedio: 0,5783), considerado adecuado para la proliferación de hongos. En el caso de las micotoxinas evaluadas (aflatoxinas - AFLs, ocratoxina A - OTA, zearalenona - ZON y esterigmatoscistina - EST), las de almacenamiento (AFLs: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2) se detectaron con un contenido de 128 µg / kg en las muestras de heno. Las condiciones de limpieza (almacén y maquinaria) son de extrema importancia, ya que las muestras recién llegadas al lugar de refugio de las ovejas se encuentran contaminadas.

**Palabras clave:** Alfalfa, heno, micotoxinas, multitoxinas, pasto, ración

### **Introdução**

Os esporos são responsáveis pela propagação dos fungos. Os de armazenagem, *Aspergillus* e *Penicillium*, por exemplo, em condições favoráveis se desenvolvem com rapidez, durante o processo de cultivo, colheita, transporte e armazenamento ([Scussel and Lorini, 2002](#)).

A secagem do feno ocorre à sombra por amontoamento. Tal procedimento proporciona condições ideais para o desenvolvimento de fungos devido à baixa aeração o que dificulta a retirada da umidade ([Nascimento et al., 2000](#)). Durante o armazenamento, os fungos (xerófilos) que resistem aos métodos de secagem podem se desenvolver em atividade de água ( $a_w$ ) tão baixa quanto 0,75, sendo que os toxigênicos a partir de 0,85 tais como os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. Esses progridem e substituem os fungos de campo que são impedidos de se desenvolver ou morrem. Nos grãos, a ação dos fungos é ativada a partir de um limite de  $a_w$  (cerca de 0,72) e temperatura de 20° C Já, as condições favoráveis de temperatura para produção de toxinas por fungos toxigênicos são (25-35°C) e mc (13-16%) ([Scussel, 1998](#), [Scussel and Lorini, 2002](#)). Cabe salientar que, os fungos de armazenagem (*Aspergillus*, *Penicillium*, incluindo *Mucor* e *Rhizopus*) são encontrados nos maquinários agrícolas (moinhos, moegas, elevadores e equipamentos) e no ambiente de armazenagem (armazéns, silos, galpões) ([Mallmann et al., 1994](#)).

A presença (ação) do fungo afeta estrutura física dos alimentos, e muitas vezes podem estar presentes seus metabólicos tóxicos. No *campo*, a contaminação é influenciada pelas condições do ambiente, como umidade relativa do ar, secagem incompleta, umidade do produto, chuvas no período de colheita, insetos, cargas de fungo no solo, ar e sanidade da planta ([Fonseca, 2008](#)). Já na *armazenagem* os fungos, menos exigentes em água, se desenvolvem inclusive os toxigênicos. As micotoxinas são metabolitos produzidos, principalmente por três gêneros fúngicos (*Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*) que podem se desenvolver nas forragens (antes, durante e pós-colheita) e na armazenagem, desde que fungos patogênicos encontrem condições para seu desenvolvimento. Dentre as micotoxinas mais estudadas são as AFLs, citrinitina, tricotecenos, como o DON (deoxinivalenol), fumonisinas, patulina, (OTA) ocratoxina A e (ZON) zearalenona que causam vários danos aos animais ([Santos et al., 2014](#), [Iamanaka et al., 2013](#), [Wambacq et al., 2016](#)). As micotoxinas (AFLs, OTA, ZON) são consideradas de risco para os consumidores, tanto animais e quanto humanos (por produtos como leite, ovos, carne e fígado). Os ruminantes são alimentados com feno e pastagem em muitas partes do mundo. As forragens podem ser contaminadas durante seu cultivo no campo ou no momento do armazenamento por várias espécies de fungos micotoxigênicos, o que podem aumentar e diversificar o risco de exposição às micotoxinas ([Gallo et al., 2015](#)).

O Grupo de toxinas de armazenagem, as AFLs, comumente encontradas em alimentos provocam graves lesões hepáticas, levando a perdas no desempenho zootécnico. Muitas vezes seus efeitos não são percebidos pelo produtor, pois essas apresentam efeitos subclínicos sobre o metabolismo dos ruminantes ([Edrington et al., 1994](#), [Rabassa et al., 2010](#), [Raper and Fennell, 1965](#)).

O objetivo do estudo foi avaliar fungos de armazenagem (carga fúngica, gênero e sua toxigenicidade) e possível contaminação por micotoxinas em alimentos utilizados por ovinos que apresentavam sintomas de debilitação semelhantes à intoxicação por AFLs e ZON.

### Material e Métodos

*Amostras:* Foram utilizados 3 diferentes tipos de alimentos para ovinos - *(a) feno de alfafa* (*Medicago sativa* L.), 10-12% mc (local de armazenamento: entrada do galpão/aprisco/sala), *(b) pasto* (*Brachiaria decumbens*), 40% mc e *(c) ração* propriamente dita (milho & soja, secos e triturados) 10% mc. Sendo os principais vegetais responsáveis pela alimentação diária dos ovinos, embora a ração esteja incluída como complemento.

*Meios de cultura, reagentes e solventes:* *(a) meios de cultura:* PDA (Potato Dextrose Ágar – PDA – Neogen (Michigan, USA), MEA (extrato de malte Ágar) e peptona bacteriológica, Himedia, (Mumbai, Índia); G25N (Czapek-Dox, 25% de nitrato de glicerol) e CYA (extrato de levedura Czapek), todos Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil); *(b) reagentes:* padrões de AFLs (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub> e AFG<sub>2</sub>), ZON e OTA, todos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA); hidróxido de sódio e potássio, fosfato, cloreto férrico, carbonato de cobre e sulfato de sódio da Merck (Jacarepaguá, RJ, Brasil); ácido acético, Neon (Suzano, SP, Brasil); ácido fórmico e sulfúrico, Biotec (Pinhais, PR, Brasil); cloreto de alumínio e sulfato de sódio anidro, Neon (São Paulo, Brasil), cloreto de potássio, Lafan (Varzea Paulista, SP, Brasil); sulfato de cobre, FMaia, (Belo Horizonte, MG, Brasil) todos de grau analítico; *(c) solventes:* acetona, Alphatec (Macaé, RJ, Brasil); etanol, ácido sulfúrico e tolueno, Synth (Diadema, SP, Brasil); sulfato de amônia e benzeno JT Backer, (Center Valley, PA, USA); clorofórmio e acetato de etila, FMaia, (Belo Horizonte, MG, Brasil), metanol, Neon (São Paulo, Brasil); *(d)*

*outros* –sacarose, glicerina líquida, cloranfenicol, todos da Kyma (Americana, SP, Brasil).

*Equipamentos:* Câmara de fluxo laminar, Veco (Campinas, SP, Brasil); autoclave vertical, Phoenix (Araraquara, SP, Brasil); cabine bacteriológica, Fanem (São Paulo, SP, Brasil); estufa Quimis (Diadema, SP, Brasil); moinho de laboratório Romer (Miami, USA); balança analítica (faixa 0,01-210 g), Ohaus, (Parsippany, NJ, USA); bomba vácuo Millipore (São Paulo, Brazil); bloco de aquecimento Tecnal (Piracicaba, SP / Brasil); extrator à vácuo, Phenomenex (Torrance, USA); medidor de aw, Aqualab, Decagon (Pullman, Washington, USA); destilador Marconi (São Paulo, Brasil); filtro de água mili-Q Millipore (St. Louis, MO, USA), placa cromatográfica Reagen, Quimibrás (Rio de Janeiro) e microscópio óptico Olympus CX22, (Tokyo, Japão).

*Coleta e preparo das amostras:* *(a) coleta:* Foi realizada tanto no local de acomodação dos animais (entrada do galpão, aprisco e sala - feno/ração) quanto no campo (piquete - pasto) na Fazenda da Ressacada, Florianópolis – SC). As amostras foram coletadas em porções de 500 g, acondicionadas em sacos de polietileno estéril e envidadas ao Laboratório de Micotoxinas e Contaminantes Alimentares para análises. As amostras de *(a.1) feno* foram separadas de acordo com o local de armazenagem em *(a.1): entrada do galpão* (coletada tão logo chegavam) e *(a.2) armazenadas* em dois locais (aprisco e sala principal). Já o *(b) capim* foi coletado no piquete na mesma quantidade que o feno e *(c) ração* no mesmo local de *(a)*; *(b) preparo das amostras* – de *(b.1) feno* e *(b.2) capim*, independentemente do tipo armazenagem e/ou umidade, todas foram picadas (3 cm) com auxílio de uma tesoura esterilizada. Já as amostras de *(b.3) ração* foram trituradas utilizando moinho Romer. Em seguida as amostras foram pesadas (porções de 50 g) para realizar análises de umidade (conteúdo de umidade e atividades água), contagem total de fungos e micotoxinas (AFLs, OTA, ZON, EST). As amostras estavam em fardos, acondicionadas no chão do aprisco e sala com temperatura média de 20° C.

*Micologia:* os testes utilizados foram *(a) contagem total de fungos* - as amostras de feno, pastagem e ração (porções de 25 g) foram assepticamente transferidas para sacos de polietileno e adicionadas de água peptonada (0,1%), seguido de homogeneização (2 min). De

cada amostra diluída ( $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$ ) um volume de 100 µl foi inoculado (na superfície do PDA (contendo cloranfenicol) ( $n = 2$ ). As placas foram incubadas em estufa ( $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ) por 7 dias (Silva et al., 2005). Após este período, as colônias desenvolvidas foram enumeradas utilizando contador de colônias e resultado expresso em unidade formadora de colônia por grama (UFC/g); (b) *isolamento* – as colônias de fungos filamentosos que cresceram no meio PDA foram repicadas assepticamente para os meios MEA, G25N e CYA e incubadas ( $25^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}/7$  dias). Após o crescimento das colônias suas características foram observadas macroscopicamente e registradas para auxiliar na identificação (gêneros) (Raper; Fennell, 1965, Pitt, 1979) seguido da (c) *identificação dos gêneros fúngicos* – pela técnica de microcultivo, que foi realizada em placa de *Petri* estéril, contendo um suporte de vidro e lâmina com meio de cultura sólido Czapek-doc (área: 5 cm), sobre o qual foram acrescentados cubos ( $\pm 10$  mm) de cada colônia isolada em (b) com auxílio de agulha estéril e sobreposta com uma lamínula adicionando algodão contendo água destilada estéril (para manter a umidade) e em seguida será fechada e incubada por 5 dias à  $25^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Após este período, a lamínula (contendo parte do crescimento fúngico) foram transferida para outra lâmina contendo uma gota de corante lactofenol azul de algodão e estruturas visualizadas em microscópio óptico [400 x]. A partir da observação das características macro e microscópicas, a identificação de gêneros fúngicos foi realizada de acordo com as chaves de identificação de Raper and Fennell (1965) e Pitt (1979).

*Micotoxinas:* O método utilizado para multi-toxinas foi o de Soares and Rodriguez-Amaya (1989). Compreende as etapas de (a) *extração foram utilizados* metanol como solvente orgânico e solução de cloreto de potássio e limpeza por partição líquido-líquido seguidas de (b) *triagem* (análise quantitativa) como objetivo de fornecer uma resposta rápida, (c) *quantificação* e (d) *confirmação* com solução de ácido sulfúrico. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos para o método foram 1 µg/kg e 2 µg/kg, respectivamente.

*Umidade:* (a) teor de umidade- para as análises de umidade das rações (2 g) foram submetidas a secagem em uma estufa ( $105 \pm 5^{\circ} \text{C}$ ) até peso constante através do método gravimétrico de acordo com a AOAC (2005). (b) *Atividade da água*

– para a determinação do  $a_w$ , cada amostra (2 g) foi submetida análise ( $n = 3$ ) utilizando o equipamento AquaLab, a  $25^{\circ} \text{C}$  (AOAC, 2005).

*Sintomas dos animais:* Os animais apresentavam fotossensibilidade acompanhada de redução nos dados zootécnicos, prostração, lesões cutâneas, anorexia e severa (*pododermatite ou foot rot*) crônica, atingindo algumas regiões desprovidas de pelos. A maioria dos animais já apresentaram fotossensibilização em algum determinado período. Os animais foram tratados com homeopatia para reduzir as enfermidades.

## Resultados e Discussão

A partir dos dados obtidos de alimentos (feno, pasto e ração) para ovinos que apresentavam sintomas de debilitação foi possível observar variações, tanto na carga fungica, gêneros isolados (*Aspergillus* e *Penicillium*) quanto em teores de umidade das amostras, inclusive com detecção elevada de AFLs, corroborando os sintomas apresentados pelos ovinos. A Tabela 1 e as Figuras 1-4 apresentam a contaminação por fungos nas diferentes amostras avaliadas, as características das cepas isoladas e a contaminação por micotoxinas.

### *Fungos de armazenagem isolados da alimentação de ovinos versus condições de umidade*

Para investigar as condições de alimentos utilizados pelos ovinos foram avaliadas a carga de esporos presentes, identificado os gêneros, bem como a umidade teor e  $a_w$  das amostras (Tabela 1).

*Carga fungica:* No que diz respeito à carga fungica, todas as amostras apresentaram crescimento, e como esperado, os esporos de fungos estavam presentes em 100% das amostras. A Tabela 1 apresenta quantificação da carga de fungos e identificação de gêneros isolados das amostras coletadas. O gênero *Aspergillus* predominou em todas as amostras. Condições controladas de armazenamento (baixa umidade e temperatura) tornam baixa a incidência de esporos de fungos contida em fenos. Entretanto, mesmo com umidade controlada (10-15%) é possível observar aumento no número de esporos (Roberts, 1995).

*Gênero isolados versus tipo de alimentação e armazenagem:* os principais gêneros de fungos isolados e identificados nas amostras de feno, pasto e ração foram *Aspergillus* e *Penicillium*, (fungos de armazenagem), porém, em menor

quantidade também o gênero *Fusarium*, (fungo de campo). Os fungos do gênero *Aspergillus* que apresentam velocidade de crescimento rápido, foram encontrados em todas as amostras de feno & pasto, independentemente do local de armazenagem (entrada, aprisco, sala) e/ou coleta (galpão ou campo) sendo que as amostras de feno de alfafa possuíam cepas aflatoxigênicas. O que

sugere a necessidade de um controle mais eficaz na aquisição de alimentos para os ovinos. Utilizando sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) em sua pesquisa [Al-Askar et al. \(2012\)](#) isolaram gêneros de fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e também *Fusarium*. Contudo, os *Aspergillus* e *Alternaria* foram os mais detectados.

**Tabela 1.** Contaminação fúngica em alimentos utilizados na dieta dos ovinos (feno, pasto e ração)

Alimentos para ovinos	Fungos			Umidade		
	*UFC/g	Gênero			mc (%)	a <sub>w</sub>
		<i>Aspergillus</i>	<i>Penicillium</i>	<i>Fusarium</i>		
<b>Feno</b>						
Alfafa Entrada do galpão	0,3 x 10 <sup>4</sup>	+	+	+	12	0,5911
Aprisco	0,3 x 10 <sup>4</sup>	+	ND	+	12	0,6410
Sala	0,3 x 10 <sup>4</sup>	+	ND	+	12	0,5029
<b>Pasto</b>						
<i>B. decumbens</i>	0,4 x 10 <sup>4</sup>	+	ND	+	40	0,9888
<b>Ração</b>						
Milho e Soja	0,06 x 10 <sup>3</sup>	+	ND	ND	10	0,6497

\*Unidade formadora de colônias (7 dias /25°C); + positivo; ND- não detectada.

As [Figuras 1 e 2](#) apresentam as características da alimentação, bem como as estruturas reprodutivas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados no feno, pasto e ração de ovinos. Importante salientar que os gêneros de fungos isolados podem ser de espécies toxigênicas, o que se confirmou, com a formação de fluorescência no meio de cultura das colônias dos respectivos gêneros ([Figura 3](#)).

*Gêneros isolados versus tipo de alimentação e armazenagem:* Os principais gêneros de fungos isolados e identificados nas amostras de feno, pasto e ração foram *Aspergillus* e *Penicillium* (fungos de armazenagem); porém, em menor quantidade também o gênero *Fusarium* (fungo de campo). Os fungos do gênero *Aspergillus* que apresentam velocidade de crescimento rápido foram encontrados em todas as amostras de feno & pasto, independentemente do local de armazenagem (entrada, aprisco, sala) e/ou coleta (galpão ou campo) sendo que as amostras de feno de alfafa possuíam cepas aflatoxigênicas. O que sugere a necessidade de um controle mais eficaz na aquisição de alimentos para os ovinos. Utilizando sementes de alfafa (*Medicago sativa* L.) em sua pesquisa [Al-Askar et al. \(2012\)](#) isolaram gêneros de fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Penicillium* e também *Fusarium*.

Contudo, os *Aspergillus* e *Alternaria* foram os mais detectados.

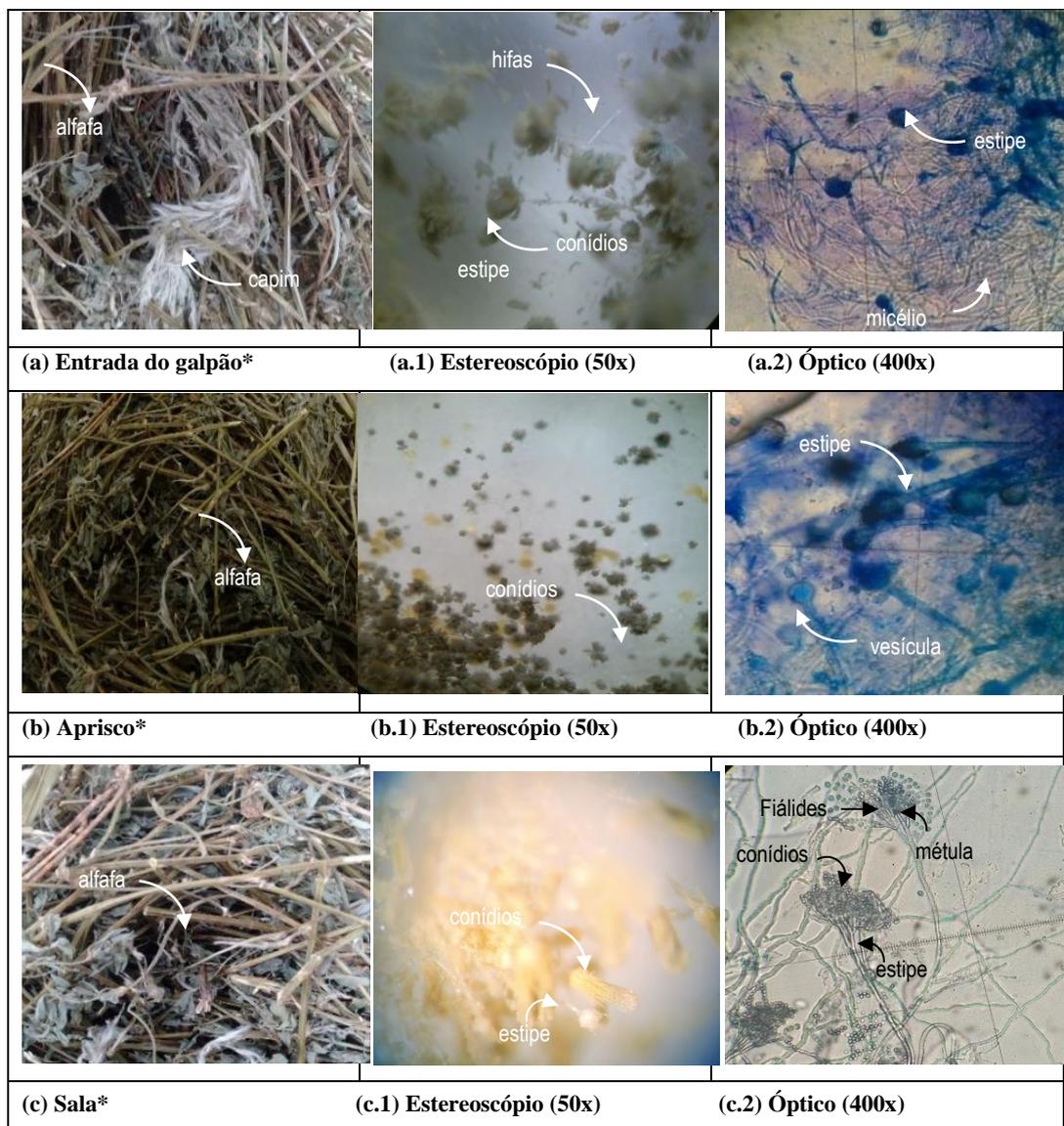
As [Figuras 1 e 2](#) apresentam as características da alimentação, bem como as estruturas reprodutivas dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* isolados no feno, pasto e ração de ovinos. Importante salientar que os gêneros de fungos isolados podem ser de espécies toxigênicas, o que se confirmou, com a formação de fluorescência no meio de cultura das colônias dos respectivos gêneros ([Figura 3](#)).

As AFLs são produzidas por algumas linhagens de fungos *A. flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, e causam grandes danos aos seres humanos e animais e uma das mais preocupantes, pois não são inativadas por aquecimento, como por exemplo, a pasteurização ([Heathcote, 1984](#), [Bruerton, 2001](#)).

*Toxigenicidade de cepas isoladas de alimentos para ovinos:* após 7 dias de incubação das colônias isolados do feno/pasto e ração, foi possível detectar produção/formação de fluorescência no meio de cultura sob as colônias fúngicas frente à luz UV – 365nm ([Figura 3](#)). Além das alterações bromatológicas, o desenvolvimento de fungos pode prejudicar saúde dos animais e das pessoas que manuseiam os fenos, devido à produção de toxinas, principalmente aquelas relacionadas aos

fungos toxigênicos do gênero *Aspergillus*. A alimentação com alta concentração de fungos e a exposição a esporos fúngicos pode ser prejudicial

à saúde dos animais, especialmente em ruminantes jovens (Lowell, 1995).



**Figura 1.** Características de alimentos para ovinos – FENO: (a/b/c) imagens macroscópicas e (a/b/c.1 e a/b/c.2) microscópicas de cepas contaminantes do gênero *Aspergillus* e *Penicillium* em microscópios estereoscópio e ótico [50 - 400x]. \* diferentes locais de armazenagem (entrada do galpão/aprisco/sala)

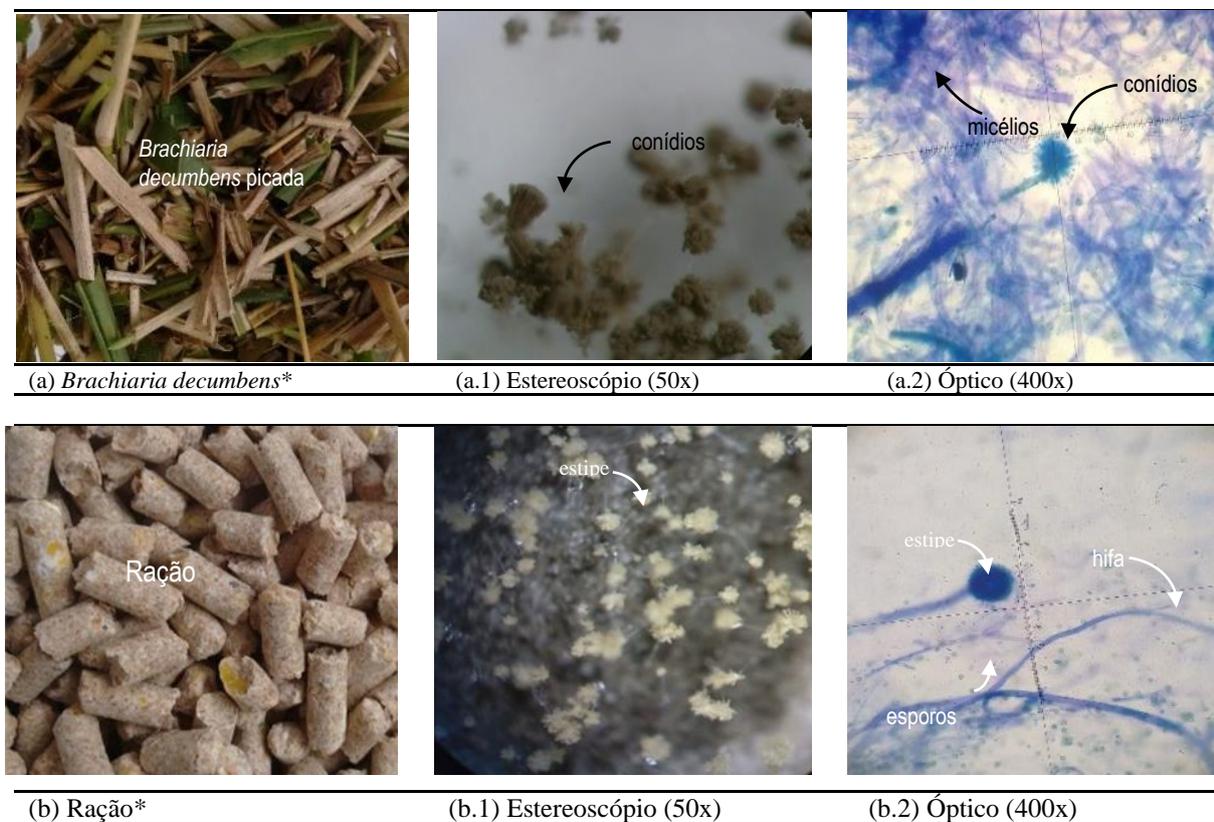
A presença de esporos está relacionada à uma doença respiratória em seres humanos chamada febre do feno. Nos animais, os distúrbios respiratórios não são intensos, com exceção dos equinos, que são acometidos problemas digestivos e respiratórios e causadas por fungos (Collins, 1995)

Umidade e atividade de água: os teores de umidade nas amostras de feno, pasto quanto ração armazenadas e coletadas na região de Florianópolis, SC apresentaram-se elevados, e, portanto, propícios à proliferação de fungos (Tabela 1). De

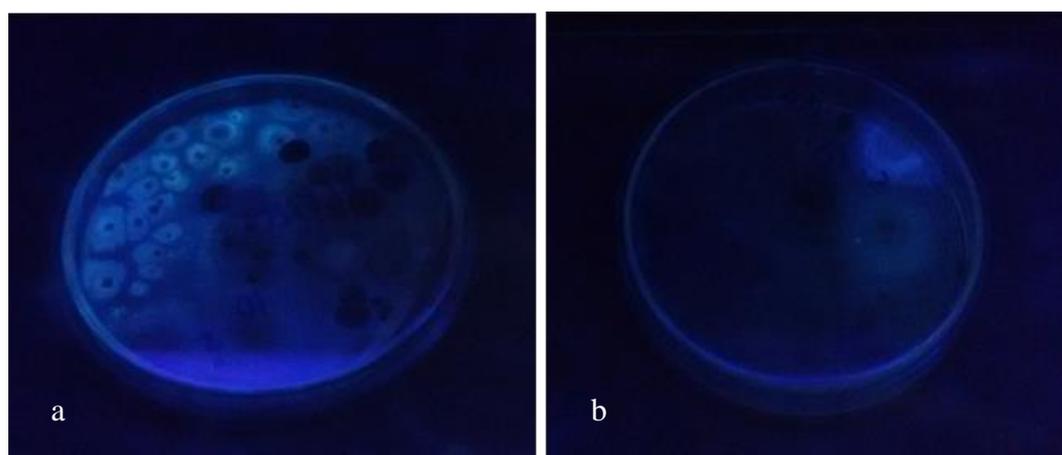
acordo com Albert et al. (1989), minimizar a atividade de água de alimentos reduz as taxas de alterações microbiológicas. Na fenação a forrageira é desidratada até atingir um teor de matéria seca que cesse a respiração celular e atividade de microrganismos indesejáveis a fim de impedir a deterioração da forragem. Com atividade da água de 1,0 e teor de umidade de (51,7-65,3%), em feno de alfafa o crescimento fúngico foi caracterizado por um vasto desenvolvimento micelial. Reduzindo ( $a_w$ ) para 0,93 e mc (28,1- 41,7%), houve um aumento no desenvolvimento das estruturas de frutificação

fúngica e reduzido crescimento micelial. Há hipóteses de que a maior produção de micotoxinas no feno (secado ao sol) está ligada à variação térmica diurna-noturna, que estimulou os fungos a

produzir toxinas antes que a forragem atingisse um teor de umidade abaixo de 15% (Albert et al., 1989).



**Figura 2.** Características de alimentos para ovinos – PASTO: *Brachiaria decumbens* e RAÇÃO (a/b) imagens macroscópicas e (a/b.1 e a/b.2) microscópicas de cepas contaminantes do gênero *Aspergillus* em microscópios estereoscópio e ótico [50 - 400x].



**Figura 3.** Microcultivo em meio de cultura (PDA) apresentando colônias de fungos toxigênicos provenientes de extrato de feno com cepas de fungos apresentando produção de aflatoxinas e sua fluorescência sob luz ultravioleta (365nm) – (a) aprisco e (b) sala.

### Micotoxinas

Quando as amostras de alimentos de ovinos foram analisadas para multitoxinas (AFLs, OTA, ZON, EST) foi possível registrar a presença de AFLs (Figura 4). Todas as amostras de feno

apresentam contaminação por AFLs, independentemente do local, tempo de armazenagem e procedência. Inclusive as amostras que recém chegaram ao galpão, o que sugere que já estavam contaminadas no local de

origem. As micotoxinas encontradas foram as de armazenagem AFLs, com teores de 128 µg/kg. Consequentemente as amostras de feno apresentaram má qualidade com relação à contaminação pelas micotoxinas analisadas. Importante ressaltar que, as AFLs são produzidas especialmente por fungos de armazenagem (*Aspergillus* sp) e que se faz necessário nos períodos de armazenamento da alimentação para ovino, de um controle e monitoramento contínuo, para evitar que a haja proliferação de fungos com subsequente produção de metabólitos. Já nas amostras *B. decumbens* e ração não foram detectadas a presença de nenhuma toxina das avaliadas.



**Figura 4.** Cromatografia em camada delgada de extratos de feno e pasto sob luz UV evidenciando a presença de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>).

*Sintomas dos ovinos versus micotoxinas detectadas:* [Döbereiner et al. \(1976\)](#) registraram surtos em ovinos e bovinos (jovens e adultos) causados por *Pithomyces charterem* encontrado em pastagens de *B. decumbens* contaminadas. Os exames histopatológicos desses animais relataram ser intoxicação por agente hepatotóxico. Várias espécies de fungos toxigênicos representam um problema mundial para vários produtos agrícolas na pré e pós-colheita. [Pavarini et al. \(2009\)](#) pela administração de bagaço de malte (resíduo cervejaria) contaminado com *Aspergillus clavatus* para ovinos, constatou sinais clínicos, predominantemente locomotores e respiratórios, onde incluíam rigidez de membros pélvicos, tremores musculares, hiperestesia, taquipnéia, e decúbito. Contudo, o apetite e a dipsia estavam normais até próximo à morte ou eutanásia. Quando grãos de cevada contaminados por *Aspergillus clavatus* foram avaliados como responsáveis pela morte de ovinos, as manifestações clínicas relatadas foram: tremores, claudicação, locomoção anormal, paralisia e

morte indicaram contaminação por micotoxicoses. Os achados patológicos foram limitados à degeneração neuronal e necrose no mesencéfalo ([Shlosberg et al., 1991](#)).

Em climas temperados, a silagem e as culturas forrageiras causam problemas ocasionais em animais. Entretanto, em países desenvolvidos micotoxinas não são consideradas um importante problema de saúde animal. Muitas vezes ocorrem problemas que vão da produtividade reduzida a mortes ocasionais. O reconhecimento das micotoxicoses é extremamente complexo, e o problema é exacerbado pela ausência de protocolos estruturados para a investigação de casos suspeitos. Sempre que houver indícios de que a micotoxina possam estar presentes em produtos de origem animal, devem ser considerados riscos de transferência para o homem.

## Conclusão

Mesmo com a armazenagem correta do feno (em locais aparentemente secos - sala de armazenagem), possuem condições favoráveis para a proliferação de fungos e consequentemente o surgimento de micotoxinas.

A contagem fúngica foi elevada e as amostras apresentaram número de colônias semelhantes, quando comparadas com a pastagem de *B. decumbens* e ração devido ao elevado teor de umidade.

As condições de limpeza dos maquinários durante a colheita do feno e dos locais de armazenagem ainda no campo são de extrema importância, uma vez que as amostras recém-chegadas ao local de abrigo das ovelhas se encontram contaminadas.

Os sintomas desencadeados nos animais em estudo foram semelhantes aos produzidos pelas toxinas encontradas nos fenos (Aflatoxinas).

## Referências Bibliográficas

- Al-Askar, A.-A. A., Ghoneem, K. M. & Rashad, Y. M. 2012. Seed-borne mycoflora of alfalfa (*Medicago sativa* L.) in the Riyadh Region of Saudi Arabia. *Annals of Microbiology*, 62, 273-281.
- Albert, R. A., Huebner, B. & Davis, L. W. 1989. Role of water activity in the spoilage of alfalfa hay. *Journal of Dairy Science*, 72, 2573-2581.

- AOAC. 2005. - *Association Official Analytical Chemist (2005)*, Official Methods of Analysis (18th ed.) edn. AOAC, Gaithersburg, Maryland, USA.
- Bruerton, K. 2001. Finding practical solutions to mycotoxins in commercial production: a nutritionist's perspective. *Alltech's 17th Annual Symposium*.
- Collins, M. 1995. Hay preservation effects on yield and quality. In: Moore, K. J., Kral, D. M. & Viney, M. K. (eds.) *Post-harvest physiology and preservation of forages*. American Society of Agronomy, Madison.
- Döbereiner, J., Tokarnia, C. H., Monteiro, M. C. C., Cruz, L. C. H., Carvalho, E. G. & Primo, A. T. 1976. Intoxicação de bovinos e ovinos em pastos de *Brachiaria decumbens* contaminados por *Pithomyces chartarum*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 11, 87-94.
- Edrington, T. S., Harvey, R. B. & Kubena, L. F. 1994. Effect of aflatoxin in growing lambs fed ruminally degradable or escape protein sources. *Journal of Animal Science*, 72, 1274-1281.
- Fonseca, H. 2008. Micotoxinas e problemas associados versus qualidade fungos. 2008. In: Scussel, V. M. (ed.) *Atualidades em micotoxinas e armazenagem de grãos*. Florianópolis, Santa Catarina.
- Gallo, A., Giuberti, G., Frisvad, J. C., Bertuzzi, T. & Nielsen, K. F. 2015. Review on mycotoxin issues in ruminants: occurrence in forages, effects of mycotoxin ingestion on health status and animal performance and practical strategies to counteract their negative effects. *Toxins*, 7, 3057-3111.
- Heathcote, J. G. 1984. Aflatoxins and related toxins. *Developments in Food Science*.
- Iamanaka, B. T., Oliveira, I. S. & Taniwaki, M. H. 2013. Micotoxinas em alimentos. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, 7, 138-161.
- Lowell, M. E. 1995. Post-harvest physiological changes in forage plants. In: Moore, K. J., Kral, D. M. & Viney, M. K. (eds.) *Post-harvest physiology and preservation of forages*. American Society of Agronomy, Madison.
- Mallmann, C. A., Santurio, J. M. & Wentz, I. 1994. Aflatoxinas-Aspectos clínicos e toxicológicos em suínos. *Ciência Rural*, 24, 635-643.
- Nascimento, J. M., Costa, C., Silveira, A. C. & Arrigoni, M. D. B. 2000. Influência do método de fenação e tempo de armazenamento sobre a composição bromatológica e ocorrência de fungos no feno de alfafa (*Medicago sativa*, L. cv. Flórida 77). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29, 669-677.
- Pavarini, S. P., Bezerra Junior, P. S., Santos, A. d. S., Bandarra, P. M., Pedroso, P. M. O., Spanemberg, A., Driemeier, D. & Ferreira, L. 2009. Intoxicação experimental por *Aspergillus clavatus* em ovinos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29, 205-210.
- Pitt, J. I. 1979. *The genus Penicillium and its teleomorphic states Eupenicillium and Talaromyces*. Academic Press, Londo, UK.
- Rabassa, V. R., Schwegler, E., Goulart, M. A., Lopes, M. S., Hoffmann, D. A., Lisboa, F. P., Vendramin, L., Roll, V. F. B., Diaz, G. J. & Del Pino, F. A. B. 2010. Parâmetros metabólicos de ovelhas submetidas a dietas contendo aflatoxina e zearalenona com adição de glucomanano modificado. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 47, 67-73.
- Raper, K. B. & Fennell, D. I. 1965. *The genus Aspergillus*. Baltimore.
- Roberts, C. A. 1995. Microbiology of stored forages. In: Moore, K. J. & Peterson, M. A. (eds.) *Post-harvest physiology and preservation of forages*. Crop Science Society of America and American Society of Agronomy, USA.
- Santos, M. C., Sousa, R. B., de Oliveira, S. E. M., Lima, K. S. C. & Lima, A. L. S. 2014. Micotoxinas e seu potencial como agentes de guerra. *Revista Virtual de Química*, 6, 761-778.
- Scussel, V. M. 1998. *Micotoxinas em alimentos*. Insular, São Paulo.
- Scussel, V. M. & Lorini, I. 2002. Fungos em grãos armazenados. In: Lorini, I., Miike, L. H. & Scussel, V. M. (eds.) *Armazenagem de grãos*. Campinas. IBG, Campinas - São Paulo.
- Shlosberg, A., Zadikov, I., Perl, S., Yakobson, B., Varod, Y., Elad, D. & Handji, V. 1991. *Aspergillus clavatus* como a causa provável de uma neurotoxicose em massa letal em ovinos. *Mycopathologia*, 114, 35-39.
- Silva, N., Neto, R. C., Junqueira, V. C. A. & Silveira, N. F. A. 2005. *Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e da Água*. Varela, Campinas, São Paulo, Brazil.

Soares, L. M. & Rodriguez-Amaya, D. B. 1989. Survey of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, and sterigmatocystin in some Brazilian foods by using multi-toxin thin-layer chromatographic method. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 72, 22-26.

Wambacq, E., Vanhoutte, I., Audenaert, K., Gelder, L. & Haesaert, G. 2016. Occurrence, prevention and remediation of toxigenic fungi and mycotoxins in silage: A review. *Journal of*

*the Science of Food and Agriculture*, 96, 2284-2302.

**Article History:**

Received 24 July 2017

Accepted 18 August 2017

Available on line 17 October 2017

**License information:** This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.